

満期産脳性麻痺群の網羅的遺伝学的解析 - 17例中9例で候補遺伝子変異を同定 -

著者	竹澤 祐介
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第18296号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00125939

満期産脳性麻痺群の網羅的遺伝学的解析

-17 例中 9 例で候補遺伝子変異を同定-

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

発生・発達医学講座小児病態学分野

竹澤 祐介

目次

1. 略語一覽	4
2. 用語解説	5
4. 研究背景	10
5. 研究目的	12
6. 研究方法	13
7. 症例提示	22
8. 研究結果	33
9. 考察	37
10. 結論	45
11. 文献	46
12. 図	55
13. 表	64

1. 略語一覧 (英字順)

ACMG	the American College of Medical Genetics and Genomics
AMP	adenosine monophosphate
CADD	combined annotation-dependent depletion
cDNA	complementary DNA
CFCS	Communication Function Classification System
CGH	comparative genome hybridization
DNA	deoxyribonucleic acid
ESP6500	the NHLBI Exome Sequencing Project
GATK	the Genome Analysis Toolkit
GMFCS	Gross Motor Classification System
HGVD	the Human Genetic Variation Database
MACS	Manual Ability Classification System
MRI	magnetic resonance imaging
mRNA	messenger RNA
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
SGA	Small-for-gestational age

2. 用語解説

【脳性麻痺機能評価スコア】

- GMFCS** 粗大運動能力分類システム。脳性麻痺患者の移動能力について I-V の 5 段階に分類する。I は介助/制限なしで移動可能、V は全介助。
- MACS** 手指操作能力分類システム。脳性麻痺患者の上肢の巧緻運動、特に物の操作について I-V の 5 段階に分類する。I は小さいものも容易に操作可能、V はごく簡単な操作（ボタンを押すなど）も不可能。
- CFCS** コミュニケーション能力分類システム。脳性麻痺患者の他者との意思疎通の能力について I-V の 5 段階に分類する。I は馴染みのない他者とも十分に相互の意思疎通が可能。V は馴染みのある他者で有効な意思疎通が困難。

【脳性麻痺病型分類】

- 痙性両麻痺** 両下肢の痙性麻痺を呈するもの。痙性麻痺には罹患した四肢の範囲に応じて痙性両麻痺以外に痙性単麻痺、片麻痺、三肢麻痺、四肢麻痺の分類がある。
- 失調型脳性麻痺** 運動失調などの小脳障害を呈するもの。
- アテトーゼ型脳性麻痺** 不随意運動（ジストニア、舞踏運動など）を呈するもの。
- 混合型脳性麻痺** 上記各分類の症候を併せもつもの。

【遺伝子変異の病的評価基準】

ACMG ガイドライン 本研究においてはアメリカ臨床遺伝・ゲノム学会が 2015 年に提唱した「Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology」を指す。遺伝子変異の病的意義を各データベースやエビデンスを参考に 5 段階（Benign, Likely benign, Unknown Significance, Likely pathogenic, Pathogenic）に分類する。

【発達検査・知能検査】

遠城寺式発達検査 運動，社会性，理解・言語の 3 領域の 6 質問項目から構成され、生後 0 か月から評価が可能。発達年齢と実年齢の比をから、発達指数（正常 = 100）を算出できる。

新版 K 式発達検査 姿勢・運動，認知・適応，言語・社会の 3 領域について検者と被検者の 1 対 1 の個別検査により生後 3 か月程度から発達指数を算出することで評価する。遠城寺式発達検査と異なり、検者にある程度の習熟が必要。

田中ビネー式知能検査 ビネー式知能検査の一種。精神年齢と生活年齢の比により知能指数（比率 IQ）を算出する。2 歳程度から評価が可能。

3. 要約

研究背景:脳性麻痺とは、乳児期までに形成される非進行性の脳障害に起因する運動と姿勢の発達の異常を包括する概念である。脳性麻痺の頻度は2例/1000出生と高く、重症例では医療経済的負担や社会的負担も大きい。脳性麻痺の原因は多様で、周産期の低酸素性脳症や新生児仮死などが主な原因として挙げられる一方、近年脳性麻痺の14%に候補遺伝子変異、9%にコピー数異常が検出されたという報告がある。問題は、どのような特徴を持つ脳性麻痺様の症例が遺伝子・染色体に起因する可能性が高いかを示す包括的な研究は行われていないことである。今回、在胎週数と脳画像がその鍵になると仮説を立てた。まず、早期産児は満期産児に比べ、はるかに脳性麻痺の有病率が高く、環境要因による脳性麻痺症例が多いことが示唆される。満期産児を対象とすることで遺伝的要因が関わる可能性の高い群を抽出することが可能になると考えた。さらに、その症例群から脳出血や低酸素性脳症などの環境・後天的要因による症例や、脳皮質形成異常や白質脳症などの脳性麻痺と明らかに異なる症例を頭部画像により除外することで、原因診断が困難である脳性麻痺の一群に効率的な遺伝学的診断を行えると考えた。

方法:対象症例を宮城県立こども病院の脳性麻痺897名のうち満期産かつ特異的な脳画像所見をもたない一群に設定した。上記対象患者群107家系のうち、同意と検体採取が可能であった17家系のDNA検体を収集し、トリオ形式（患者と両親）で全エクソーム解析（次世代シーケンサーによる全エクソンの網羅的遺伝学的解析）および

マイクロアレイCGH解析（微細な染色体欠失・重複を検出）を行った。スプライス部位の変異（*CTNNB1*および*AMPD2*）については患者血液から逆転写PCRを行うことで異常なメッセンジャーRNAの配列を確認した。また*AMPD2*ミスセンス変異については当該患者由来のリンパ芽球細胞を用いてデアミナーゼアッセイを行い、健常成人の細胞の結果と比較することで機能解析を行なった。これらの検出された遺伝子変異を米国臨床遺伝・ゲノム学会のガイドラインに沿って病的意義を評価した。

結果:既知の疾患原因遺伝子のみで17名中9名に8つの遺伝子（*CTNNB1*, *CYP2U1*, *SPAST*, *GNAO1*, *CACNA1A*, *AMPD2*, *STXBP1*, *SCN2A*）の候補変異を検出した。これは対象を選別していない脳性麻痺の既報に比べて有意（98例中14例, $p < 0.005$, Fisher's exact test）に高率であった。また、9名中6名の変異遺伝子（*CTNNB1*, *CYP2U1*, *GNAO1*, *CACNA1A*, *AMPD2*, *SCN2A*）はてんかん性脳症や痙性対麻痺の神経疾患原因遺伝子として報告されているが、脳性麻痺としての報告は初めてであった。スプライス部位の変異についてはいずれもスプライシング異常が起きていることが確認でき、その結果タンパクの短縮が起こることが予想された。患者由来の細胞では健常者由来の細胞と比較して*AMPD2*デアミナーゼ活性が60%程度減少していることが確認された。一方で本患者群に病的変異が疑われるコピー数異常は認めなかった。

考察と今後の課題：在胎週数と頭部画像は脳性麻痺患者から遺伝疾患を抽出する為の重要な手がかりになりうることを示すことができた。脳性麻痺からの効率的な遺伝疾患の診断・分離は、個々の患者の治療、予後予測、遺伝カウンセリングに直接的に寄与することができると考えられる。症例数が少ないため、本研究の知見を一般化するには今後の症例数の蓄積、および本研究の選択基準に当てはまらない脳性麻痺群の同一条件下での遺伝子変異特定率の比較が必要である。

4. 研究背景

脳性麻痺は小児期の身体障害の原因として重要な疾患の一つであり、「受胎から新生児期のあいだに生じた脳の非進行性病変に基づく、永続的なしかし変化しうる運動および姿勢の異常である」と定義されている¹⁾。この定義が示すように、脳性麻痺とは単一の疾患概念を表すものではなく、その原因や症状、重症度には幅がある。脳性麻痺の頻度は1000出生あたり2例と高く、重症例では医療経済的負担や社会的負担も大きい。主な原因は周産期の感染、低酸素、新生児仮死や早産児の側脳室周囲白質軟化症などであるが、原因不明の脳性麻痺症例も少なくない²⁾。遺伝的要因と環境要因の双方が脳性麻痺の原因に関与していると考えられてきたが、近年の研究では、従来想定されていた1-2%よりも高い確率で遺伝子変異や染色体のコピー数異常が脳性麻痺の病因に関与している可能性があることが示唆されている²⁾。例えば、McMichaelらは98症例の脳性麻痺患者とその両親にトリオ全エクソーム解析を行い、14症例に病的遺伝子変異を認めたと報告し、Oskouiらは脳性麻痺患者115症例中11例（9.6%）に有意な染色体コピー数異常を認めたと報告している^{3,4)}。一方では、周産期の環境要因（新生児仮死や脳出血など）による脳性麻痺と遺伝学的異常による脳性麻痺を区別するため、後者を脳性麻痺と誤って診断された遺伝疾患と捉える見方も提唱されている⁵⁾。いずれにしても、多様な原因からなる脳性麻痺群からこれらの遺伝学的異常を鑑別することは患者の適切な治療、予後予測、遺伝カウンセリングなどを行う上で極めて重要であるが、脳性麻痺と診断され

た患者のうち、どのような特徴をもつ患者群に対して遺伝学的検索を行うべきかは現時点では明らかになっていない。本研究では、在胎週数と頭部 MRI 画像に着目した。近年のメタアナリシスの研究では在胎 37 週未満の早期産児においては脳性麻痺のリスクが劇的に高まることが示されている⁶⁾。これは早期産児において環境要因への脆弱性を示していると考えられ、仮に早期産児と満期産児において遺伝疾患の有病率が同等であると仮定すると、脳性麻痺と診断される症例の中に遺伝疾患が含まれる確率は満期産児でより高いと考えられる。しかし、文献的な考察では満期産の脳性麻痺に焦点を絞って遺伝学的検査を行った研究はない。加えて、頭部 MRI 画像は脳性麻痺の診断や鑑別診断に重要なものであり、脳性麻痺の主な原因とされている低酸素性脳症や脳出血、脳室周囲白質軟化症などの遺伝学的な関与が少ない要因や^{7, 8)}、その他の診断アプローチ、例えば代謝スクリーニング検査やターゲットシーケンスなどを用いることで診断できる疾患（*COL4A1* 変異による孔脳症⁹⁾やホモシスチン尿症による脳梗塞¹⁰⁾など）を除外することができる。そのため頭部 MRI 画像で特異的な所見を示さない症例を解析対象とすることで、全エクソーム解析によって遺伝学的異常を発見できる可能性の高い患者群を抽出できると考えた。

以上の背景と仮説により、本研究では（1）在胎 37 週以上で出生し、かつ（2）頭部 MRI 画像で正常もしくは非特異的な所見を示した脳性麻痺の患者群に対し全エクソーム解析とマイクロアレイ CGH (Comparative genome hybridization: 比較ゲノムハイブリダイゼーション) 解析を行った。

5. 研究目的

以下の三点を本研究の目的とした。

- I. 一定の条件に当てはまる脳性麻痺患者群の遺伝学的解析により， 候補遺伝子および染色体コピー数異常を同定する。
- II. 候補遺伝子の機能解析を必要に応じて行い， 原因遺伝子であることを証明する。
- III. 条件に当てはまる脳性麻痺患者群での遺伝学的異常の検出率を明らかにする。

6. 研究方法

I. 解析対象

1990 年 9 月 1 日から 2016 年 12 月 31 日の間に拓桃医療療育センター(現宮城県立こども病院)に 897 名の脳性麻痺患者が通院していた。これらの脳性麻痺患者は痙直型(対麻痺, 三肢麻痺, 四肢麻痺), アテトーゼ型, 失調型, 混合型に分類されていた。そのうち (1) 明らかな後天的要因がなく, (2) 在胎週数 37 週以上の, (3) 頭部 MRI 画像における所見が正常もしくは他の疾患が示唆されない非特異的所見である, という 3 つの条件を満たす患者は 107 名であった。これらのうち, 17 名とその両親 (17 家系) の同意と検体が得られた。(図 1)

II. 倫理

本研究においては、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会および宮城県立こども病院で承認(2015-1-694, 2015-1-695)された、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究の説明と協力をお願い」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究への協力の同意文書」により本研究と試料採取の医学的意義について説明を行った。両親および成人患者本人からは文書および口頭でのインフォームドコンセント、未成年患者もしくは十分な説明においても適切な同意を得ることが困難である成年患者においては代諾者からインフォームドコンセントを得たうえで、血液および臨床情報を収集した。未成年患者においては可能な限りインフォームドアセントを得るよう努めた。

III. 方法

1 臨床情報収集

各々の患者につき、カルテより臨床的データを収集した。その項目は、性別、周産期歴、在胎週数、出生時体重、身長、頭囲、新生児期の病歴、脳性麻痺のタイプ、合併症、頭部 MRI 画像所見、脳性麻痺の機能評価スコア（GMFCS [Gross Motor Classification System: 粗大運動能力分類システム], MACS [Manual Ability Classification System: 手指操作能力分類システム], CFCS [Communication Function Classification System: コミュニケーション能力分類システム])¹¹⁻¹³⁾などである。脳性麻痺のタイプは既報を元に、痙直型（対麻痺、三肢麻痺、四肢麻痺）、アテトーゼ型、失調型、混合型に分類した¹⁴⁾。¹⁵⁾ MRI 撮影は東芝製 MRT 50A (0.5 Tesla) もしくは島津-Marconi 社製 Magnex Eclipse scanner (1.5 Tesla) を使用した。

2 遺伝学的検査

(1) DNA の抽出

対象患者群および各患者の両親のゲノム DNA (deoxyribonucleic acid: デオキシリボ核酸) は, PAXgene Blood DNA キット (キアゲン, ヒルデン, ドイツ) を用いて末梢静脈血から抽出した。

(2) アレイ CGH 解析

アレイ CGH 解析には, SurePrint G3 Human CGH + SNP マイクロアレイ 4 × 180 K (アジレントテクノロジー, サンタクララ, アメリカ) を使用した。解析には, サンプル DNA 1.5 μ g および性染色体のコピー数異常を判別するため性別を合致させた日本人の健康成人の対照 DNA 1.5 μ g を使用した。製造元のプロトコールに従って, 制限酵素を用いて切断した DNA に蛍光色素 Cy3 (対照), Cy5 (サンプル) による標識反応 (ラベリング) を行った。ラベル化 DNA を精製濃縮したのちに, サンプルおよび対照のラベル化 DNA を同量混和し, アレイスライド上で, 65°C, 20 rpm で 24 時間ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後, アレイスライドを洗浄し, DNA マイクロスキャナでスキャンした。コピー数変化は CytoGenomics 2.5 (アジレントテクノロジー, サンタクララ, アメリカ) を用いて検出し, その病的意義は Cytogenomic Arrays (ISCA) データベース, the

Genomic Variants¹⁶⁾データベースおよび我々の施設のコントロールデータベース

(n = 100)を用いて評価した。

(3) 全エクソーム解析

全エクソーム解析は、前述の17家系に対してトリオ全エクソーム解析を行った。

解析にはHiSeq2500（イルミナ，サンディエゴ，アメリカ）を用い，ライブラリー作成にはシュアセレクトXT Human All Exon V5（標的領域：50 Mb）又は V6（標的領域：60 Mb）キット（アジレントテクノロジー，サンタクララ，アメリカ）を製造元のプロトコールに従って使用した。解析の簡略化手順を以下に示す。BWA 0.6.2-r126¹⁷⁾を用いて，ヒトゲノム参照配列（hg19）での配列マッピングを行った。変異の検出は，GATK (the Genome Analysis Toolkit) v. 1.6-13¹⁸⁾で行い，アノテーションにはANNOVAR¹⁹⁾を用いた。変異の絞り込みは以下の手順で行った（図2）。まず，エクソン領域またはスプライシング領域の変異のみを残し，アミノ酸置換を伴わない同義置換点変異を除いた。次に，各データベースを参照し，検索する遺伝形式に応じて一定頻度以上の対立遺伝子頻度がある変異を除外した。*de novo* 変異(常染色体優性形式)については1000 Genomes database, ESP6500 (the NHLBI Exome Sequencing Project), the ExAC database version 0.3 (全集団および東アジア人集団), HGVD (the Human Genetic Variation Database)^{20, 21)}に登録されている変異があればこれを除外した。次に常染色体劣性遺伝形式および性染色体優性遺伝形式については，まず上記各データベースで1%以上の頻度がある変異については除外した。さらに各データベースにホモ接合体，もしくはX染色体であればヘミ接合体が登録されている場合はこれを除外した。以上の条件を満たした

変異から、OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) で神経発達疾患を候補変異として抽出した。各々の候補変異を、2015年に提唱された遺伝子変異の病的意義を判定する基準の一つである米国臨床遺伝・ゲノム学会 (the American College of Medical Genetics and Genomics: ACMG) ガイドライン²²⁾に照らし合わせて評価した。また、候補変異に対応するアミノ酸置換における種の保存性と病的意義の予測をSIFT (URL: <http://sift.jcvi.org/>)²³⁾, PolyPhen2 HVAR (URL: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)²⁴⁾, CADD (combined annotation-dependent depletion)²⁵⁾のツールを用いて評価した。全ての候補変異は各変異が抽出された患者とその両親のDNAについてサンガーシーケンスで確認した。サンガーシーケンスで使用したプライマーを表1に示す。

3 疾患候補新規変異 (*CTNNB1* および *AMPD2*) における追加解析

(1) cDNA 解析

CTNNB1 および *AMPD2* の変異によるスプライシング異常を証明するため、全血を PAXgene RNA Blood RNA キット (ID: 52304, キアゲン, ヒルデン, ドイツ) を用い、製造元のプロトコールに従い *CTNNB1* および *AMPD2* の変異をもつ各患者および対照として日本人の健康成人 2 名から検体を採取し、RNA (ribonucleic acid: リボ核酸) を抽出した。cDNA は PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047A, タカラバイオ, 滋賀, 日本) を用い、製造元のプロトコールに従い合成した。得られた cDNA を *CTNNB1* と *AMPD2* の cDNA をタカラ ExTaq ホットスタートバージョン (RR006A, タカラバイオ, 滋賀, 日本) を用いて増幅し、電気泳動とサンガーシーケンスで配列を確認した。プライマーの一覧を表 1 に示す。

(2) AMP (adenosine monophosphate: アデノシン一リン酸) デアミナーゼアッセイ

AMPD2 変異をもつ患者 1 名と同変異をもたない脳性麻痺患者 1 名および日本人の健康成人 2 名の血液から白血球を抽出し、過去の報告のプロトコールに従い²⁶⁾, EB ウイルスに感染させることでリンパ芽球の培養系を確立した。*AMPD2* の活性を評価するために EB ウイルス感染リンパ芽球を用いて、過去の報告²⁷⁾に一部修正を加えて AMP デアミナーゼアッセイを行なった。以下に詳細を記す。まず、リンパ

芽球細胞を氷冷したバッファー(250 mM スクロース, 150 mM 塩化カリウム, 20 mM イミダゾール塩酸塩)に溶解し, 蛋白濃度をピアース BCA プロテインアッセイキット (サーモサイエンティフィック, ウォルサム, アメリカ) を用いて測定する。

2 μ g の蛋白を含むように希釈した抽出物を 50 mM クエン酸ナトリウム (pH7.0), 50 mM 塩化カリウム, 4 mM AMP からなる水溶液と混合する。背景コントロールとして各蛋白抽出物に AMP を混入しない水溶液も同様に作成した。試薬 A (10 mM フェノール, 20 mM ニトロプルシドナトリウム) 100 μ l と混合し 25°C で 1 時間インキュベーションし, その後試薬 B (12.5 mM 水酸化ナトリウム, 20 mM リン酸水素二ナトリウム, 0.01% 次亜塩素酸ナトリウム) 100 μ l と混合した。25 度で 3 時間インキュベーションしたのち, サンプルの吸光度(625nm)を SPECTRA Max 190 マイクロプレートリーダー (Molecular Devices, サニーベイル, カナダ) を用いてコントロールとの差を測定した。基準となる各濃度のアンモニアを用意し, その吸光度と比較する事で各サンプルのアンモニア濃度を定量した。計 3 回の実験を行い, 各実験のばらつきを最小化するため, 結果は 3 つのコントロールサンプルの平均をとり, その平均濃度とサンプルの濃度との吸光度比を計算した。統計解析は一元配置分散分析をダネット法と共に用いて行なった。

7. 症例提示

I. 本患者群の特徴

合計 17 名とその両親が解析の対象となった (図 1)。11 人が男性 (64.7%) で年齢の中央値は 9.5 歳 (3-30 歳), 全ての家系が日本人であり近親婚は認めなかった。診断時年齢の中央値とフォローアップ期間はそれぞれ 40 か月 (16-178 か月) と 84 か月 (16-358 か月) であった。患者は以下のように 4 つの脳性麻痺のタイプ【痙性両麻痺 (11, 64.7%), アテトーゼ型 (3, 17.6%), 失調型 (2, 11.8%), 混合型 (1, 5.9%)】に分類された。全ての患者が 2 歳以下に発症した孤発性であり, 進行性を認めず, 脳性麻痺の定義¹⁾に合致した。患者 2 のみマスクバッグによる新生児蘇生が行われた。10 名 (58.8%) が正常の頭部 MRI 画像所見であり, そのほかの 7 名は非特異的な所見であった (図 3)。奇形症候群である VATER 症候群が 1 名含まれたが, 脳性麻痺との直接の関連を示す文献を認めないため, 解析対象とした。患者 4 以外の全例で知的障害を最終フォローアップの段階で認めている。全患者の臨床データを下記および表 2 に示す。

II. 各患者の臨床経過

1 患者 1

男性，在胎 40 週にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重，身長，頭囲はそれぞれ 3066 g (-0.5 SD)，49.0 cm (-0.2 SD)，34.0 cm ($+0.5$ SD) であった。出生時の両親の年齢は父 33 歳，母 28 歳であった。4 歳上の兄を含め，特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。生後 8 ヶ月時よりアテトーゼ型四肢麻痺と全般性発達遅滞，視神経萎縮を認めた。1 歳および 6 歳時の頭部 MRI 所見は正常であった。最終フォローアップの 8 歳の時点で 3 語文を話すことができた。患者の GMFCS，MACS，CFCS はそれぞれ 5，5，3 であった。

2 患者 2

男性，在胎 41 週 4 日にて出生した。出生時に胎便吸引症候群を認めた。蘇生に対する反応は良好であり、5 分時点でのアプガースコアは 7 点であったが呼吸状態が安定しないため以後 10 日間の人工呼吸器管理を受けた。また同時期に動脈管開存症も指摘されていたが結紮術などの侵襲的治療は要さなかった。出生体重，身長はそれぞれ 3310 g (-0.3 SD)，45.0 cm (-2.9 SD) であった。出生時の両親の年齢は父 33 歳，母 32 歳であった。7 歳上の兄と 2 歳上の姉を含め，特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。生後 6 ヶ月時より痙性両麻痺と全般性発達遅滞を認めた。乳児期よりてんかんの診断でカルバマゼピンとバルプロ酸ナトリウムを内服し

ている。10 歳時の頭部 MRI 所見は正常であった。最終フォローアップの 30 歳の時点で言葉を話すことができていない。患者の GMFCS, MACS, CFCS はそれぞれ 5, 5, 3 であった。

3 患者 3

男性，在胎 40 週 6 日にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重，身長，頭囲はそれぞれ 3428 g (+0.7 SD), 49.0 cm (-0.5 SD), 35.0 cm (+1.1 SD) であった。出生時の両親の年齢は父 29 歳，母 34 歳であった。5 歳下の弟を含め，特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。左眼の角膜混濁，過剰驚愕症，四肢の硬直を新生児期より認めていた。生後 9 か月時に運動発達遅滞に対する理学療法目的に受診した。当時の身体診察により仮死の過緊張，体幹失調，ギャラント反射の亢進，錐体路兆候を伴わない過剰驚愕症が明らかとなった。その結果から原因不明のアテトーゼ型四肢麻痺の診断で経過観察された。血漿アミノ酸分析や尿中有機酸分析，乳酸・ピルビン酸，糖，ホモバリニン酸，ハイドロキシインドール酢酸を含む髄液検査に異常を認めなかった。タンデムマススクリーニングでも特記すべき異常を認めず，過剰驚愕症の既知遺伝子にも病的意義を疑う変異を認めなかった。G バンド分染法では正常変異である 46, XY, inv(9)(p12q13)を認めるのみであった。1 歳および 4 歳時の頭部 MRI 所見は正常であった。2 歳 6 か月頃に下肢の痙性と全般性発達遅滞が明らかとなった。はいはいと支持下での立位が可能であっ

た。3歳頃からボツリヌス毒素による痙性の治療が開始された。最終フォローアップの7歳の時点で二語文を話せるようになったものの、過剰驚愕症は持続している。患者のGMFCS, MACS, CFCSはそれぞれ4, 3, 3であった。

4 患者4

男性、在胎40週6日にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重、身長、頭囲はそれぞれ3208 g (-0.4 SD), 50.5 cm (+0.4 SD), 33.5 cm (-0.1 SD)であった。出生時の両親の年齢は父31歳、母27歳であった。5歳上の姉を含め、特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。生後3か月頃から下肢の痙性と筋力低下を認めた。4歳時点での頭部MRI所見は正常であった。5歳時のK-ABC検査による知能検査は正常域であった。最終フォローアップの9歳の時点でのGMFCS, MACS, CFCSはそれぞれ3, 1, 1であった。

5 患者5

男性、在胎38週4日にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重、身長、頭囲はそれぞれ2890 g (-0.4 SD), 48.5 cm (0.0 SD), 32.5 cm (-0.5 SD)であった。出生時の両親の年齢は父28歳、母28歳であった。5歳下の妹を含め、特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。1歳の時点で座位不可のため医療機関を受診した。身体所見にて痙性両麻痺が明らかとなった。12歳時点での頭部MRIでは左側脳室周囲の深部白質にT2強調画像で軽度高信号の病変認めた。13歳時点

での新版 K 式発達検査による発達指数は 22 と低値であった。最終フォローアップの 28 歳の時点での GMFCS, MACS, CFCS はそれぞれ 4, 5, 2 であった。

6 患者 6

男性, 在胎 37 週 4 日にて出生した。前期破水と臍帯巻絡があったが明らかな仮死や低酸素は認めなかった。出生体重, 身長はそれぞれ 3182 g (+1.0 SD), 50.0 cm (+1.2 SD) であった。出生時の両親の年齢は父 38 歳, 母 32 歳であった。2 歳上の兄と 1 歳下の妹を含め, 特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。2 歳時に歩容異常にて医療機関を受診した。身体診察にて痙性両麻痺が明らかとなった。同時期にてんかんと診断され, カルバマゼピン内服で再発を認めていない。2 歳時の頭部 MRI は正常であった。6 歳頃の田中ビネー式知能検査で IQ は 82 であった。最終フォローアップの 7 歳の時点での GMFCS, MACS, CFCS はそれぞれ 2, 1, 1 であった。

7 患者 7

女性, 在胎 38 週 3 日にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重, 身長, 頭囲はそれぞれ 2780 g (-0.6 SD), 47.1 cm (-0.7 SD), 32.5 cm (-0.5 SD) であった。出生時の両親の年齢は父 33 歳, 母 33 歳であった。2 歳上の兄を含め, 特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。生後 9 か月頃からアトローゼ型四肢麻痺と全般性発達遅滞を認めた。1 歳 6 か月時の頭部 MRI の T2 強調画像で左

の三角部白質のわずかな高信号を認めた。6歳時の遠城寺式発達検査では発達指数60であった。最終フォローアップの7歳の時点で発語は不可能であったが、タブレットコンピュータを介したコミュニケーションがわずかに可能であった。患者のGMFCS, MACS, CFCSはそれぞれ5, 5, 4であった。

8 患者8

男性、在胎40週4日にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重、身長、頭囲はそれぞれ3120 g (-0.5 SD), 46.0 cm (-2.0 SD), 34.0 cm (+0.4 SD)であった。出生時の両親の年齢は父38歳、母31歳であった。5歳上の兄を含め、特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。企図振戦を主訴に2歳頃に医療機関を受診した。身体診察にて上肢の企図振戦および痙性両麻痺、自閉傾向を指摘された。10歳時の頭部MRIは正常であった。最終フォローアップの15歳の時点でのGMFCS, MACS, CFCSはそれぞれ1, 1, 2であった。

9 患者9

女性、在胎41週にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重、身長、頭囲はそれぞれ3548 g (+1.3 SD), 53.0 cm (+1.8 SD), 32.0 cm (-1.3 SD)であった。出生時の両親の年齢は父29歳、母29歳であった。2歳下の妹を含め、特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。1歳頃に低緊張と全般性発達遅滞を認め、医療機関を受診した。診察および検査にて小脳失調と軽度の頭部への叩打刺激

により誘発される部分てんかんが明らかとなり、脳波異常は認めなかったがカルバマゼピンで治療されている。5 歳時の頭部 MRI は正常であった。6 歳頃の田中ビネー式知能検査で IQ は 29 であった。13 歳頃の頭部 MRI では小脳半球のわずかな萎縮を認めた。最終フォローアップの 13 歳の時点での GMFCS, MACS, CFCS はそれぞれ 4, 4, 4 であった。

10 患者 10

男性、在胎 40 週にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重、身長、頭囲はそれぞれ 3086 g (0.0 SD), 50.0 cm (+0.3 SD), 33.0 cm (-0.3 SD) であった。出生時の両親の年齢は父 42 歳、母 33 歳であった。兄弟なし。特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。1 歳 8 か月頃運動発達遅滞を主訴に医療機関を受診した。身体診察にて痙性両麻痺を指摘された。2 歳時点での頭部 MRI 所見は正常であった。客観的な知能検査は受けていない。最終フォローアップの 8 歳の時点での GMFCS, MACS, CFCS はそれぞれ 4, 3, 2 であった。

11 患者 11

女性、在胎 38 週 2 日にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重、身長、頭囲はそれぞれ 2554 g (-0.6 SD), 43.0 cm (-2.5 SD), 30.0 cm (-2.2 SD) であった。出生時の両親の年齢は父 26 歳、母 24 歳であった。兄弟なし。特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。7 か月頃に全般性発達遅滞を主訴に医療

機関を受診した。身体診察により痙性両麻痺と上肢および体幹の低緊張を指摘された。また不眠と自閉傾向も伴っていた。7か月時点での頭部MRI所見は正常であったが、4歳時点の頭部MRI、T2強調像での線条体の高信号および脳梁の菲薄化を認めた。脳脊髄液の乳酸およびピルビン酸、血漿アミノ酸分析、タンデムマススクリーニングを含む代謝スクリーニングは正常範囲内であった。3歳時の遠城寺式発達検査では発達指数27であった。最終フォローアップの5歳の時点でのGMFCS, MACS, CFCSはそれぞれ4, 4, 5であった。

12 患者 12

女性、在胎39週2日にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重、身長、頭囲はそれぞれ3134 g (+0.4 SD), 51.0 cm (+1.1 SD), 33.0 cm (-1.1 SD)であった。出生時の両親の年齢は父36歳、母36歳であった。2人の兄を含め、特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。生後10か月時に尖足歩行および全般的発達遅滞を主訴に医療機関を受診した。身体診察で失調および特発性尖足歩行を指摘された。また歩隔の拡大と企図振戦と伴っていた。2歳および3歳時の頭部MRI所見はいずれも正常であった。3歳時の遠城寺式発達検査では発達指数46であった。最終フォローアップの3歳の時点で会話は不可能であり、GMFCS, MACS, CFCSはそれぞれ2, 4, 4であった。

13 患者 13

男性，在胎 40 週にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重，身長，頭囲はそれぞれ 3304 g (+0.6 SD)，52.0 cm (+1.5 SD)，31.8 cm (-1.2 SD) であった。出生時の両親の年齢は父 29 歳，母 28 歳であった。2 人の弟と 1 人の妹を含め，特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。2 歳時に全般性発達遅滞を主訴に医療機関を受診した。診察にて自閉傾向と不眠，痙性両麻痺が明らかとなった。2 歳時点での頭部 MRI で側脳室の拡大と脳梁の菲薄化を認めた。9 歳頃の田中ビネー式知能検査で IQ は 64 であった。最終フォローアップの 10 歳の時点での GMFCS，MACS，CFCS はそれぞれ 1，2，2 であった。

14 患者 14

女性，在胎 38 週 2 日にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重，身長，頭囲はそれぞれ 2930 g (-0.2 SD)，47.8 cm (-0.9 SD)，31.5 cm (-1.4 SD) であった。出生時の両親の年齢は父 27 歳，母 30 歳であった。兄弟なし。特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。1 歳頃に発達遅滞を主訴に医療機関を受診した。痙性両麻痺と後頭葉てんかんを指摘され，バルプロ酸ナトリウムで治療されている。5 歳時の頭部 MRI では大脳白質の萎縮と脳梁菲薄化を認めた。最終フォローアップの 22 歳の時点で発語はなく，GMFCS，MACS，CFCS はそれぞれ 4，4，5 であった。

15 患者 15

女性，在胎 37 週 1 日にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重，身長，頭囲はそれぞれ 1736 g (-2.6 SD)，43.0 cm (-1.9 SD)，31.0 cm (-1.2 SD) であった。椎体奇形，鎖肛，食道閉鎖，尿管膀胱逆流症を伴っており，VATER 症候群と診断された。出生時の両親の年齢は父 35 歳，母 27 歳であった。兄弟なし。特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。徐々に痙性両麻痺と失調，全般的発達遅滞が明らかとなっていく。また感音性難聴と甲状腺機能低下症も合併していた。2 歳時の頭部 MRI は正常であった。13 歳時点での新版 K 式発達検査による発達指数は 40 と低値であった。最終フォローアップの 6 歳の時点では発語は不可能であったが，上肢を使ったジェスチャーである程度のコミュニケーションをとることが可能であった。その時点での GMFCS，MACS，CFCS はそれぞれ 2，3，3 であった。

16 患者 16

男性，在胎 37 週にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重，身長，頭囲はそれぞれ 3298 g (+1.7 SD)，49.8 cm (+1.3 SD)，35.5 cm (+2.1 SD) であった。出生時の両親の年齢は父 31 歳，母 28 歳であった。3 歳年上の兄と 3 歳下の弟を含め，特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。生後 6 か月時に発達遅滞を主訴に医療機関を受診し，アテトーゼ型四肢麻痺と全般的発達遅滞を指摘された。7 か月および 9 か月時の頭部 MRI では T2 強調画像で淡蒼球の高信号を指摘さ

れていたが、2歳6か月時点での頭部MRIでは異常を認めなかった。脳脊髄液の乳酸およびピルビン酸、血漿アミノ酸分析、タンデムマススクリーニングを含む代謝スクリーニングは正常範囲内であった。最終フォローアップの8歳の時点では不明瞭な発語が可能であり、その時点でのGMFCS、MACS、CFCSはそれぞれ4、3、3であった。

17 患者 17

男性、在胎37週にて特に周産期の経過に異常なく出生した。出生体重、身長、頭囲はそれぞれ3094 g (+1.1 SD), 49.6 cm (+1.2 SD), 36.0 cm (+2.5 SD)であった。出生時の両親の年齢は父38歳、母31歳であった。姉を含め、特記すべき神経疾患の家族歴は認めなかった。1歳頃に発達遅滞および自閉傾向を主訴に医療機関を受診した。診察にて痙性両麻痺を認めた。経過中てんかんを発症したがレベチラセタムとバルプロ酸ナトリウムを服用し痙攣の再発を認めていない。経過観察中に顕微的血尿および溶血を指摘されたが、自然軽快している。4歳時の頭部MRI所見は正常であった。最終フォローアップの19歳の時点では発語は不可能であった。GMFCS、MACS、CFCSはそれぞれ2、4、5であった。

8. 研究結果

I. 遺伝子検査

1 アレイ CGH 解析

アレイ CGH 解析で脳性麻痺の表現型に関連する病的意義を疑われるコピー数変化を認めなかった。患者 2 では G バンド法でも認めていた 47XXY の染色型が指摘されたが、この染色型と脳性麻痺との関連を指摘した報告は認めなかった。

2 全エクソーム解析

全エクソーム解析により、17名中11名に計17の臨床的に関連している候補変異を発見した（表3）。これらのうち、患者7名、6遺伝子（*CTNNB1*, *CYP2U1*, *SPAST*, *GNAO1*, *CACNA1A*, および *AMPD2*）の計8種類の変異が病的変異、患者2名、2遺伝子（*STXBP1*, *SCN2A*）の2つが病的可能性のある変異であるとACMGガイドラインに則って分類した（表3）²²⁾。

病的意義があると分類された変異を持つ患者の大部分（77.8%, 9名中7名）が *de novo* であった。残りの2名は常染色体劣性遺伝であり、そのうちの1名は複合ヘテロ変異であった。2名（患者6と10）で *SPAST* 遺伝子の変異を認めた。これらの病的意義があると分類された4つの遺伝子（*SPAST*, *GNAO1*, *CACNA1*, *STXBP1*）の計5つの変異は既に過去の報告で病的意義を指摘されていた変異であった²⁸⁻³³⁾。その一方でその他の遺伝子変異（*CTNNB1*, *CYP2U1*, *AMPD2*, *SCN2A*）は今までの報告のない変異であった。全ての特定された候補変異の遺伝子のうち、*SPAST*, *STXBP1*, *SPTBN2*は脳性麻痺の原因遺伝子としての報告があった³⁴⁻³⁶⁾。5名に特定された5つの遺伝子（*UBA1*, *AMER1*, *FAT4*, *GPR98*, *SPTBN2*）の計8つの候補変異については病的意義が不明確であると分類された。*SPTBN2*の p.(Arg524Trp)を除けば機能解析、既報、種の保存性、ツールを用いた病的意義予測のいずれにおいても病的意義を示唆する根拠はなかった。したがって、本研究においてはこれらの候補変異を考慮しないこととした。

II. 疾患候補新規変異 (*CTNNB1* および *AMPD2*) における追加解析

1 cDNA 解析

今回の研究において 2 つのスプライスサイトの候補変異 (*CTNNB1*, Chr3 : 41275790 T>C および *AMPD2*, Chr1 : 110168415 G>A) をそれぞれ患者 3 と患者 11 において特定した。このスプライスサイト変異がどのようにメッセンジャー RNA の翻訳に影響しているかを逆転写 PCR を用いて調べた。それぞれの遺伝子の野生型と変異型の該当部位の cDNA (図 4) をシーケンスした。その配列からは、スプライシング異常によりコードするベータカテニン 1 タンパクと *AMPD2* タンパクが短縮することが推測された。患者 3 における *CTNNB1* の変異はフレームシフトを起こし、第 572 コドンが終止コドンとなることで野生型のタンパクより短縮することが予想された(p. Glu562AlafsTer11) (図 4A, B)。患者 11 における *AMPD2* の変異ではスプライス異常の結果変異直後の第 216 コドンが終止コドンとなり野生型タンパクより短縮されることが予想された (p. Leu173Ter) (図 4C, D)。これらの結果はそれぞれの変異の病原性を支持していると考えられた。

2 AMP デアミナーゼアッセイ

AMPD2 遺伝子は 3 種類知られている AMP を IMP に変換する AMP 脱アミノ化酵素 (AMPD) のうちの一つをコードしている。核酸の合成やタンパクの翻訳に必須な酵素である²⁷⁾。患者 11 で同定された *AMPD2* の複合ヘテロ変異 の病原性を評価するために、AMP 脱アミノ化酵素の活性を測定した。その結果 2 患者の健常人コントロールおよび患者 3 のリンパ芽球と比較して約 60% 酵素活性の低下を確認した (図 5)。

9. 考察

アレイ CGH 解析と全エクソームシーケンスによる包括的な遺伝学的検索を 17 人の満期産かつ非特異的頭部 MRI 所見を示す脳性麻痺患者に対して行なった。そのうち 9 名（7 名は *de novo*, 2 名は常染色体劣性遺伝形式）に ACMG ガイドラインに則って判断した病的意義を持つと考えられる変異を特定した。特定した 8 種類の遺伝子のうち 3 遺伝子（*CYP2U1*, *SPAST*, *AMPD2*）は痙性対麻痺の遺伝子, 4 遺伝子（*SCN2A*, *CACNA1A*, *GNAO1*, *STXBP1*）はてんかん性脳症の遺伝子, 残りの 1 遺伝子（*STXBP1*）はその他の神経発達疾患の遺伝子であった。*AMPD2* と *CTNNB1* 遺伝子における 2 種類のスプライスサイト変異と *AMPD2* のミスセンス変異の病原性について, *in vitro* の実験で確認した。

選別されていない脳性麻痺 98 例のうち 14 例（14.3%）において候補変異が特定された報告³⁾と比較し, 本研究における検出率は有意に高率であった（ $p < 0.005$, Fisher's exact test）。さらに, 仮に既報において当研究と同様に ACMG ガイドライン²²⁾に則りかつ既知の神経発達疾患にのみ候補変異を絞り込んだ場合, 変異の検出率は 4%（98 例中 4 例）にまで減少する。患者背景が異なるものの, 特異的な画像所見のない満期産の脳性麻痺は, 通常の脳性麻痺よりも脳性麻痺に類似した遺伝疾患を含む可能性が高いことが示唆され, この群に対してエクソーム検査を行うことは効率的な検査系になりうると考えられた。トリオ全エクソーム解析により診断

された，神経発達疾患 78 例中 11 例が脳性麻痺様の症状であったという近年の報告も本研究の結果を間接的に支持するものと考えられた³⁶⁾。

本研究では，脳性麻痺の 9.6～31%に有意なコピー数変化が認められたとする既報^{4, 37)}とは異なり，有意なコピー数変化は検出されなかった。この差異は患者選択の条件や，病的意義を判定する方法の違いによるものかもしれない。特定の症候群に当てはまらない Small-for-gestational age (SGA) 児でありかつ低身長が持続する小児例のアレイ CGH 解析において 16%と高率に有意なコピー数変化を認めたという報告³⁸⁾がある。対して本研究の患者群では SGA 児は VATER 症候群を伴う 1 名のみであり，上記の特定の症候群に当てはまらない SGA 児を含まないことがコピー数変化の検出率が低い一因になっている可能性は否定できない。本研究の結果は特異的な画像所見のない満期産の脳性麻痺においてはアレイ CGH 解析による診断確率は低いことが示唆されたが，少ない患者数での結果であり，診断のための検査の優先順位の判断材料とするにはさらに大規模での調査が必要であると考えられた。本研究では 4 名の患者において 3 つの遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子 (*CYP2U1*; 患者 5, *SPAST*; 患者 6, 10, *AMPD2*; 患者 11)を検出した。遺伝性痙性対麻痺は進行性の痙性と下肢の筋力低下を主にきたす多様な神経疾患である³⁹⁾。現在までに 55 以上の痙性対麻痺の原因遺伝子が特定されている。痙性対麻痺は臨床的に単純型と複合型に分類され，後者では失調，知的障害，てんかんなどの他の中枢神経疾患を合併する³⁹⁾。本研究の対象患者では長期にわたるフォローアップ (51～260 ヶ月)におい

て非進行性の痙性両麻痺を示し、これは遺伝性痙性対麻痺よりも脳性麻痺の診断基準により当てはまる^{1, 39)}。このことはこれらの遺伝子が遺伝性痙性対麻痺を引き起こすだけでなく、脳性麻痺の痙性両麻痺の診断基準に当てはまる表現型を示しうることを示唆している。患者 5 において *CYP2U1* のホモ接合性ナンセンス変異を認めた。この *CYP2U1* の変異は SPG56 を引き起こすと報告されており³⁹⁾、患者 5 の症状は知的障害を併発しており、SPG56 の症状と類似している³⁹⁾。患者 6 と 10 において、それぞれ既知の変異を *SPAST* 遺伝子に認めた^{28, 29)}。*SPAST* は SPG4 をきたと報告されており、これは遺伝性痙性対麻痺の中でも最も頻度の高い疾患群である³⁹⁾。患者 6 と 10 は比較的軽症の痙性であり、これは SPG4 の表現型と矛盾しない。患者 11 は *AMPD2* 遺伝子の複合型ヘテロ接合性変異であり、この病原性を評価するため患者由来のリンパ芽球細胞を用いてデアミナーゼ活性の評価を行い、活性の低下を確認した。*AMPD2* 遺伝子は 3 種類知られている AMP を IMP（イノシトールリン酸）に変換する AMP 脱アミノ化酵素（AMPD）のうちの一つをコードしており、その機能喪失による神経細胞内のアデノシンの蓄積が神経毒性をもち神経変性を起こすことが示唆されている⁴⁰⁾。*AMPD2* の遺伝子変異ではおもに橋小脳低形成症で報告されてきたが²⁷⁾、近年遺伝性痙性対麻痺の患者に *AMPD2* のフレームシフト変異が報告された⁴⁰⁾。この報告と本研究の報告を合わせることで、*AMPD2* 変異の患者の表現型を拡張することを示すことができると考えた。

病的意義があると考えられた 4 つのてんかん性脳症の遺伝子変異が 4 名

(*GNAO1*; 患者 7, *CACNA1A*; 患者 9, *STXBPI*; 患者 12, *SCN2A*; 患者 17)に

対し検出された。*GNAO1*の変異はてんかん性脳症を含む神経発達疾患を呈し、そのおもな症状はてんかん、知的障害、不随意運動などである。てんかんを除く各症状は患者 7 と一致していた。失調型の脳性麻痺と診断されていた患者 9 に

CACNA1A の p. (Ser218Leu)変異が認められた。別の変異(p. phe1502del)ではあるが先天性の小脳失調と診断された症例に *CACNA1A* の変異を認めたことが報告されており、その報告例と患者 9 は症状が酷似していた⁴¹⁾。それにとどまらず

CACNA1A の変異は様々な神経精神疾患を呈する。本患者群で同定されたものと同じ p. (Ser218Leu) 変異はてんかん性脳症³²⁾だけでなく、家族性片麻痺性片頭痛や小脳失調症とも関連していた³¹⁾。この小脳失調症が先天的に発症し、かつ症状が進行しなければ、患者 9 と同様に失調型脳性麻痺と診断されていた可能性がある。

STXBPI は当初てんかん性脳症の原因遺伝子として報告されていた。それに加えて近年では自閉症スペクトラム、痙性、低緊張、失調、不随意運動などの様々な表現型を含む症例が報告されている。*STXBPI* の 5%はてんかんを示さないことも報告されており、さらに患者 12 の症状（てんかんを伴わない失調、企図振戦、知的障害）と同じ変異を持つ既報症例の症状は酷似していた³³⁾。同変異が患者 12 の症状をもたらしている可能性は高いと考えられた。また、*SCN2A* の変異を伴う複数の症例においててんかんに加えて知的障害、自閉症スペクトラム、不随意運動、下肢の痙性

を呈することが報告されており⁴²⁾、このことで患者 17 の症状の原因を説明できるかもしれない。しかし患者 17 は *SPTBN2* の複合ヘテロ接合性変異も同時に伴っている。*SPTBN2* は常染色体優性遺伝形式と劣性遺伝形式の双方で橋小脳失調症を来す⁴³⁾が、脳性麻痺を来すという報告もある³⁵⁾。本患者では両アレルとも病的意義は不明と判定されており、*SCN2A* のみが病態に寄与しているとしても矛盾はしないが、*SPTBN2* の両変異が病態を修飾している可能性は否定できない。

これまでに挙げた遺伝性系麻痺とてんかん性脳症の原因遺伝子の他に、*CTNNB1* 遺伝子の変異を患者 3 に検出した。*CTNNB1* 遺伝子はカドヘリンを介した細胞接着因子及び Wnt シグナル伝達経路における転写制御因子として働く β カテニンをコードしている。 β カテニンは神経細胞の樹状突起の形成に関わることも示唆されており、その機能喪失により中枢神経疾患をきたすことが想定される⁴⁴⁾。同遺伝子は常染色体優性形式をとる精神遅滞の原因遺伝子として報告されているが、その多くでは進行性の痙性両麻痺、低緊張、小頭症、顔面頭蓋奇形、過剰驚愕症などの多彩な症状を呈する⁴⁴⁾。患者 3 は過剰驚愕症を伴う知的障害と痙性両麻痺を呈しており、これは *CTNNB1* 変異を伴う症例の表現型と矛盾しないと考えられた。

病的意義があると判断した 8 つの遺伝子のうち 6 つの遺伝子 (*CTNNB1*, *CYP2U1*, *GNAO1*, *CACNA1A*, *AMPD2*, *SCN2A*) では、表現型は上述した様に脳性麻痺との類似点は多いものの、今までに脳性麻痺の原因遺伝子として報告され

たことはない。これはおそらく経過中の発達退行や症状の進行が見られないことや発症年齢が幼児期以降であったなど、脳性麻痺の定義と合わない部分が存在したためであろう。したがって、これらの遺伝子変異は様々な広いスペクトラムの神経発達疾患、例えば遺伝性痙性対麻痺、様々な症状を伴う知的障害、てんかん性脳症、そして脳性麻痺様の症候群を来すのかもしれない。原因遺伝子を特定することは患者の管理に良い影響を与える可能性がある。例えば、脳深部刺激療法は *GNAO1* 遺伝子の変異を伴う症例の不随意運動を著明に改善したという報告がある⁴⁵⁾。患者 7 も同治療が奏効する可能性があると考えられた。さらに、まだマウスモデルでの実験ではあるが、患者 7 に変異が特定された *CACNA1A* 遺伝子が原因遺伝子となる脊髄小脳変性症の 6 型をマイクロ RNA を用いた治療が奏効したという報告があり、将来的な治療のターゲットになりうると考えられた⁴⁶⁾。

本研究にはいくつかの限界がある。まず第一に、サンプルサイズの問題が挙げられる。今回は選択されていない脳性麻痺 98 症例を調査した既報に比べて有意に高率に遺伝子変異を特定できたが、本研究ではクライテリアに当てはまらない脳性麻痺群については調査してはおらず、一般的な脳性麻痺との比較はできていない。さらに既報では在胎週数や頭部 MRI の所見が記載されていない症例も多く、同一の条件下での比較は行えなかったため、既報と比較することによる結論の一般化も困難である。第二に、本研究では後方視的に患者情報を収集しており、患者の症状の経過や詳細、例えばアプガースコア、てんかんの臨床的な分類や脳波などのデータが不

足している点が挙げられる。そのため既報の表現型との比較に齟齬が生じる可能性を否定できない。第三に、本研究では主に欧米のデータベースを用いているため、人種差の考慮が不十分である。今後は、その問題を解消するために東北メディカルメガバンク機構のデータベースである 3.5KJPN の利用を考慮する必要がある。第四に、今回特定した遺伝子変異による疾患の既報での表現型と本研究における患者群の表現型には、ある程度の差異が存在することが挙げられる。本研究では検出した遺伝子変異についての詳細な機能解析は行なっていない。そのため、動物モデルでの機能解析実験や同一変異で同一の症状をきたしている症例の確認が本研究の結果の確定には必要である。これらの確認が欠けていることは、例え各変異を ACMG ガイドラインに準拠して病的意義を判定しているとしても今回の遺伝子変異が単独で病態をきたしているのではなく、病態に寄与する多因子のうちの一つでしかないという可能性を残していることになる。第五に、患者数が少ないために表現型、例えば脳性麻痺のサブタイプや知的障害と遺伝子変異の関連に対するまとまった考察が困難であることが挙げられる。6 例の痙性両麻痺の患者のうち 4 例は遺伝性痙性対麻痺の原因として報告されている遺伝子 (*CYP2U1*, *SPAST*, *AMPD2*) の変異を伴っていた。残り 2 例は他の神経発達疾患の原因遺伝子 (*CTNNB1*, *SCN2A*) の変異を伴っておりかつ痙性両麻痺としての報告例はなかったものの、症状として下肢の痙性を伴う症例はそれぞれ報告されている^{34, 42)}。失調やアテトーゼ型を含むその他の表現型に関してはさらに患者数が少なく傾向を推察することも困難であった。知

的障害に関しては，本患者群では1例を除く全ての患者に認めた(94.1%)。この確率は過去の脳性麻痺全体の報告 (77.5%)よりも高い傾向⁴⁷⁾にあった。これは我々の患者群の特徴を示唆しているのかもしれないが，脳性麻痺症例での正確な評価はそもそも困難であり⁴⁸⁾，また患者数も少ないことから明らかに有意であるとはいえない。より大規模な CP 患者群でにおける全ての在胎週数や頭部 MRI 所見を含めた，様々なデータを収集した包括的な解析が脳性麻痺およびその類似例における遺伝学的な背景を明らかにするためには必要であると考えられた。

10. 結論

今回の研究は、2つの単純な条件（満期産および非特異的頭部 MRI 所見）で絞り込まれた脳性麻痺患者群に高率に遺伝疾患が含まれている可能性を示した。より大規模な遺伝学的検索を行うことがこの研究の結果を支持する、あるいはその他の遺伝疾患が高率に含まれる脳性麻痺の患者群を特定することに必要であり、ひいては脳性麻痺や脳性麻痺に類似する神経疾患の分子的基盤を明らかにする一助になりうると考えられた。

11.文献

1. Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl* 2007;109:8-14.
2. MacLennan AH, Thompson SC and Gecz J. Cerebral palsy: causes, pathways, and the role of genetic variants. *Am J Obstet Gynecol* 2015;213:779-788.
3. McMichael G, Bainbridge MN, Haan E, et al. Whole-exome sequencing points to considerable genetic heterogeneity of cerebral palsy. *Mol Psychiatry* 2015;20:176-182.
4. Oskoui M, Gazzellone MJ, Thiruvahindrapuram B, et al. Clinically relevant copy number variations detected in cerebral palsy. *Nat Commun* 2015;6:7949.
5. Lee RW, Poretti A, Cohen JS, et al. A diagnostic approach for cerebral palsy in the genomic era. *Neuromolecular Med* 2014;16:821-844.

6. Oskoui M, Coutinho F, Dykeman J, et al. An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol* 2013;55:509–519.
7. Himmelmann K, Horber V, De La Cruz J, et al. MRI classification system (MRICS) for children with cerebral palsy: development, reliability, and recommendations. *Dev Med Child Neurol* 2016;59:57–64.
8. Wimalasundera N and Stevenson VL. Cerebral palsy. *Pract Neurol* 2016;16:184–194.
9. Gould DB, Phalan FC, Breedveld GJ, et al. Mutations in Col4a1 cause perinatal cerebral hemorrhage and porencephaly. *Science* 2005;308:1167–1171.
10. Cardo E, Campistol J, Caritg J, et al. Fatal haemorrhagic infarct in an infant with homocystinuria. *Dev Med Child Neurol* 1999;41:132–135.
11. Palisano RJ, Rosenbaum P, Bartlett D, et al. Content validity of the expanded and revised Gross Motor Function Classification System. *Dev Med Child Neurol* 2008;50:744–750.

12. Eliasson AC, Krumlinde-Sundholm L, Rosblad B, et al. The Manual Ability Classification System (MACS) for children with cerebral palsy: scale development and evidence of validity and reliability. *Dev Med Child Neurol* 2006;48:549–554.
13. Hidecker MJ, Paneth N, Rosenbaum PL, et al. Developing and validating the Communication Function Classification System for individuals with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2011;53:704–710.
14. Numata Y, Onuma A, Kobayashi Y, et al. Brain magnetic resonance imaging and motor and intellectual functioning in 86 patients born at term with spastic diplegia. *Dev Med Child Neurol* 2013;55:167–172.
15. Christine C, Dolk H, Platt MJ, et al. Recommendations from the SCPE collaborative group for defining and classifying cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol Suppl* 2007;109:35–38.
16. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, et al. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D986–992.
17. Li H and Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009;25:1754–1760.

18. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010;20:1297–1303.
19. Wang K, Li M and Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010;38:e164.
20. Narahara M, Higasa K, Nakamura S, et al. Large-scale East-Asian eQTL mapping reveals novel candidate genes for LD mapping and the genomic landscape of transcriptional effects of sequence variants. *PLoS One* 2014;9:e100924.
21. Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, et al. Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *J Hum Genet* 2016;61:547–553.
22. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405–424.

23. Ng PC and Henikoff S. SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research* 2003;31:3812–3814.
24. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;7:248–249.
25. Kircher M, Witten DM, Jain P, et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 2014;46:310–315.
26. Hui-Yuen J, McAllister S, Koganti S, et al. Establishment of Epstein-Barr virus growth-transformed lymphoblastoid cell lines. *J Vis Exp* 2011.
27. Akizu N, Cantagrel V, Schroth J, et al. AMPD2 regulates GTP synthesis and is mutated in a potentially treatable neurodegenerative brainstem disorder. *Cell* 2013;154:505–517.
28. Braschinsky M, Tamm R, Beetz C, et al. Unique spectrum of SPAST variants in Estonian HSP patients: presence of benign missense changes but lack of exonic rearrangements. *BMC Neurol* 2010;10:17.

29. Crippa F, Panzeri C, Martinuzzi A, et al. Eight novel mutations in SPG4 in a large sample of patients with hereditary spastic paraplegia. *Arch Neurol* 2006;63:750–755.
30. Saitsu H, Fukai R, Ben-Zeev B, et al. Phenotypic spectrum of GNAO1 variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. *Eur J Hum Genet* 2016;24:129–134.
31. Kors EE, Terwindt GM, Vermeulen FL, et al. Delayed cerebral edema and fatal coma after minor head trauma: role of the CACNA1A calcium channel subunit gene and relationship with familial hemiplegic migraine. *Ann Neurol* 2001;49:753–760.
32. Epi KC, Epilepsy Phenome/Genome P, Allen AS, et al. De novo mutations in epileptic encephalopathies. *Nature* 2013;501:217–221.
33. Stamberger H, Nikanorova M, Willemsen MH, et al. STXBP1 encephalopathy: A neurodevelopmental disorder including epilepsy. *Neurology* 2016;86:954–962.
34. Blair MA, Riddle ME, Wells JF, et al. Infantile onset of hereditary spastic paraplegia poorly predicts the genotype. *Pediatr Neurol* 2007;36:382–386.

35. Parolin Schnekenberg R, Perkins EM, Miller JW, et al. De novo point mutations in patients diagnosed with ataxic cerebral palsy. *Brain* 2015;138:1817–1832.
36. Srivastava S, Cohen JS, Vernon H, et al. Clinical whole exome sequencing in child neurology practice. *Ann Neurol* 2014;76:473–483.
37. Segel R, Ben-Pazi H, Zeligson S, et al. Copy number variations in cryptogenic cerebral palsy. *Neurology* 2015;84:1660–1668.
38. Canton AP, Costa SS, Rodrigues TC, et al. Genome-wide screening of copy number variants in children born small for gestational age reveals several candidate genes involved in growth pathways. *Eur J Endocrinol* 2014;171:253–262.
39. Lo Giudice T, Lombardi F, Santorelli FM, et al. Hereditary spastic paraplegia: clinical-genetic characteristics and evolving molecular mechanisms. *Exp Neurol* 2014;261:518–539.
40. Novarino G, Fenstermaker AG, Zaki MS, et al. Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *Science* 2014;343:506–511.

41. Garcia Segarra N, Gautschi I, Mittaz-Crettol L, et al. Congenital ataxia and hemiplegic migraine with cerebral edema associated with a novel gain of function mutation in the calcium channel CACNA1A. *J Neurol Sci* 2014;342:69–78.
42. Howell KB, McMahon JM, Carvill GL, et al. SCN2A encephalopathy: A major cause of epilepsy of infancy with migrating focal seizures. *Neurology* 2015;85:958–966.
43. Ikeda Y, Dick KA, Weatherspoon MR, et al. Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet* 2006;38:184–190.
44. Kuechler A, Willemsen MH, Albrecht B, et al. De novo mutations in beta-catenin (CTNNB1) appear to be a frequent cause of intellectual disability: expanding the mutational and clinical spectrum. *Human Genetics* 2015;134:97–109.
45. Kulkarni N, Tang S, Bhardwaj R, et al. Progressive Movement Disorder in Brothers Carrying a GNAO1 Mutation Responsive to Deep Brain Stimulation. *J Child Neurol* 2016;31:211–214.

46. Miyazaki Y, Du X, Muramatsu S, et al. An miRNA-mediated therapy for SCA6 blocks IRES-driven translation of the CACNA1A second cistron. *Sci Transl Med* 2016;8:347ra394.
47. Gabis LV, Tsubary NM, Leon O, et al. Assessment of Abilities and Comorbidities in Children With Cerebral Palsy. *J Child Neurol* 2015;30:1640–1645.
48. Sherwell S, Reid SM, Reddihough DS, et al. Measuring intellectual ability in children with cerebral palsy: can we do better? *Res Dev Disabil* 2014;35:2558–2567.

12. 図

図 1

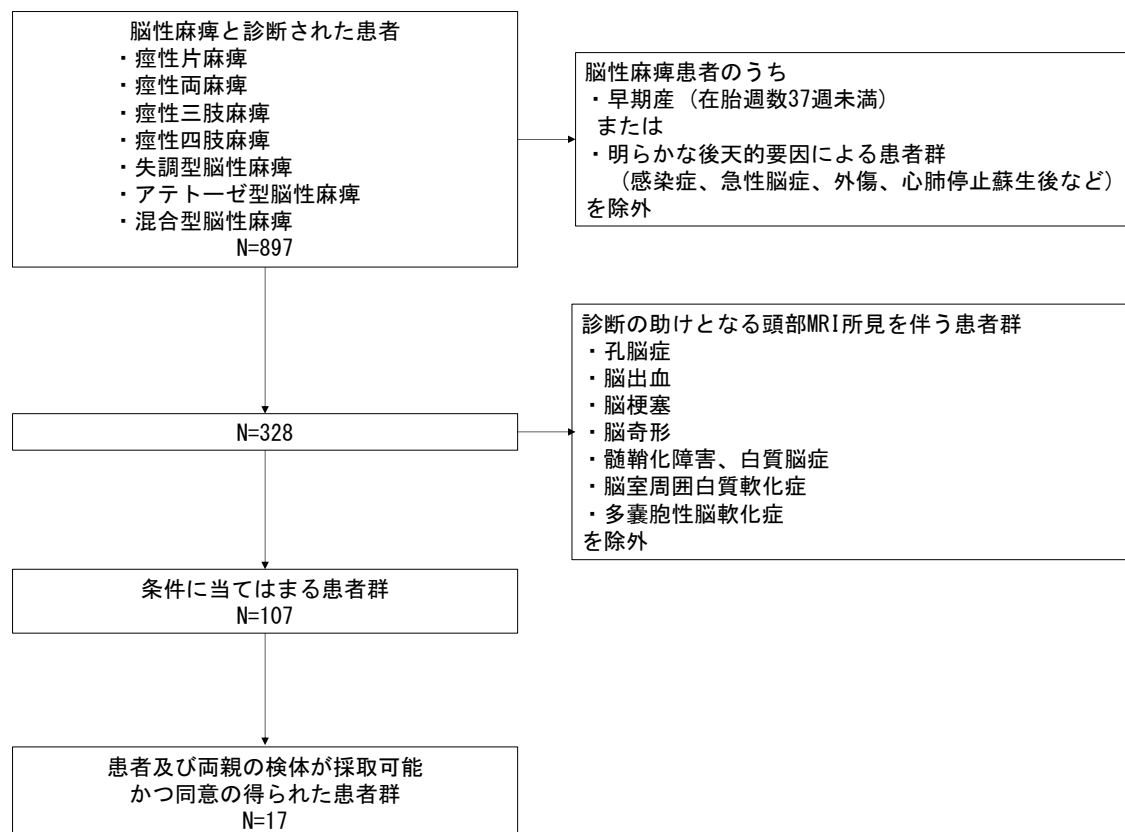


図 2

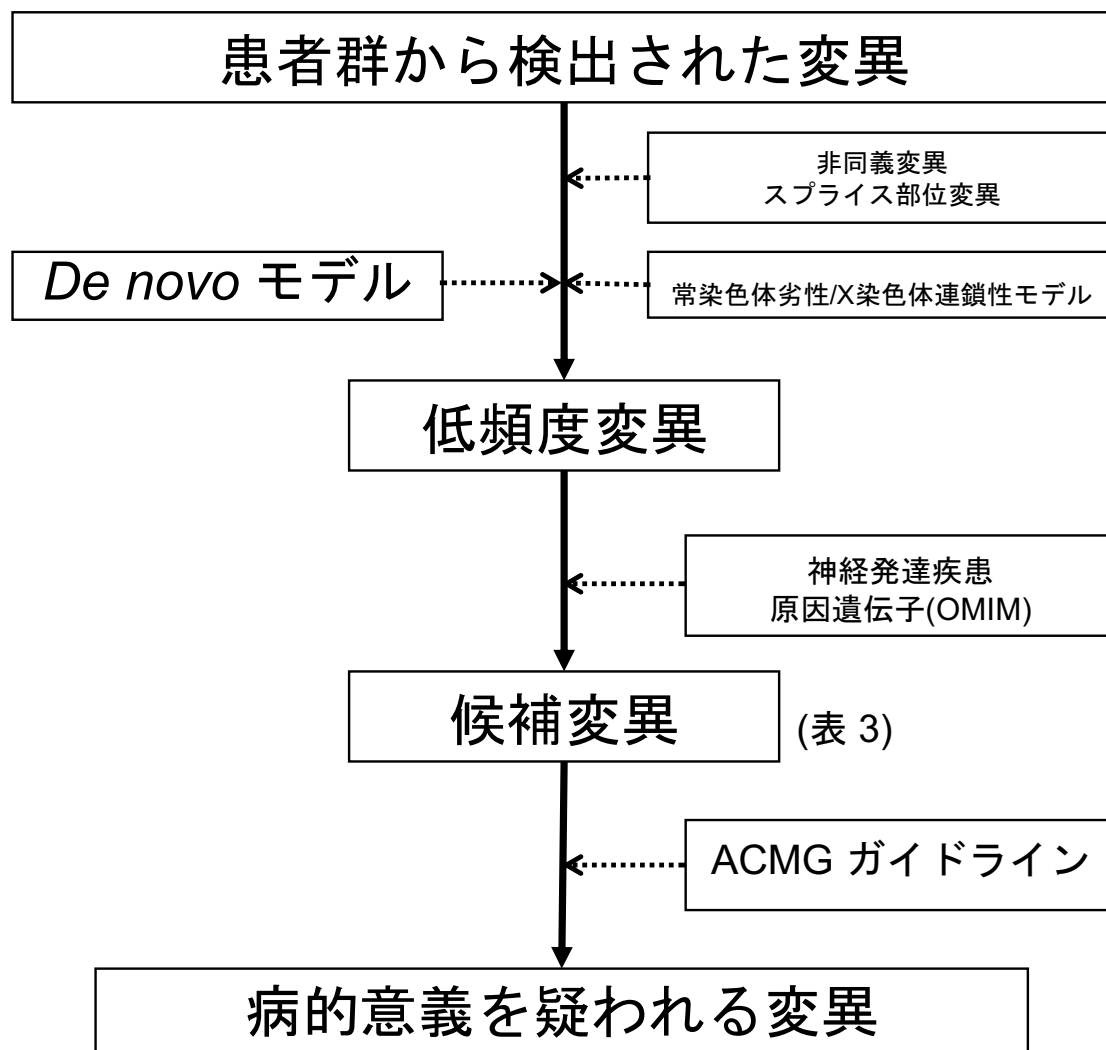


图 3

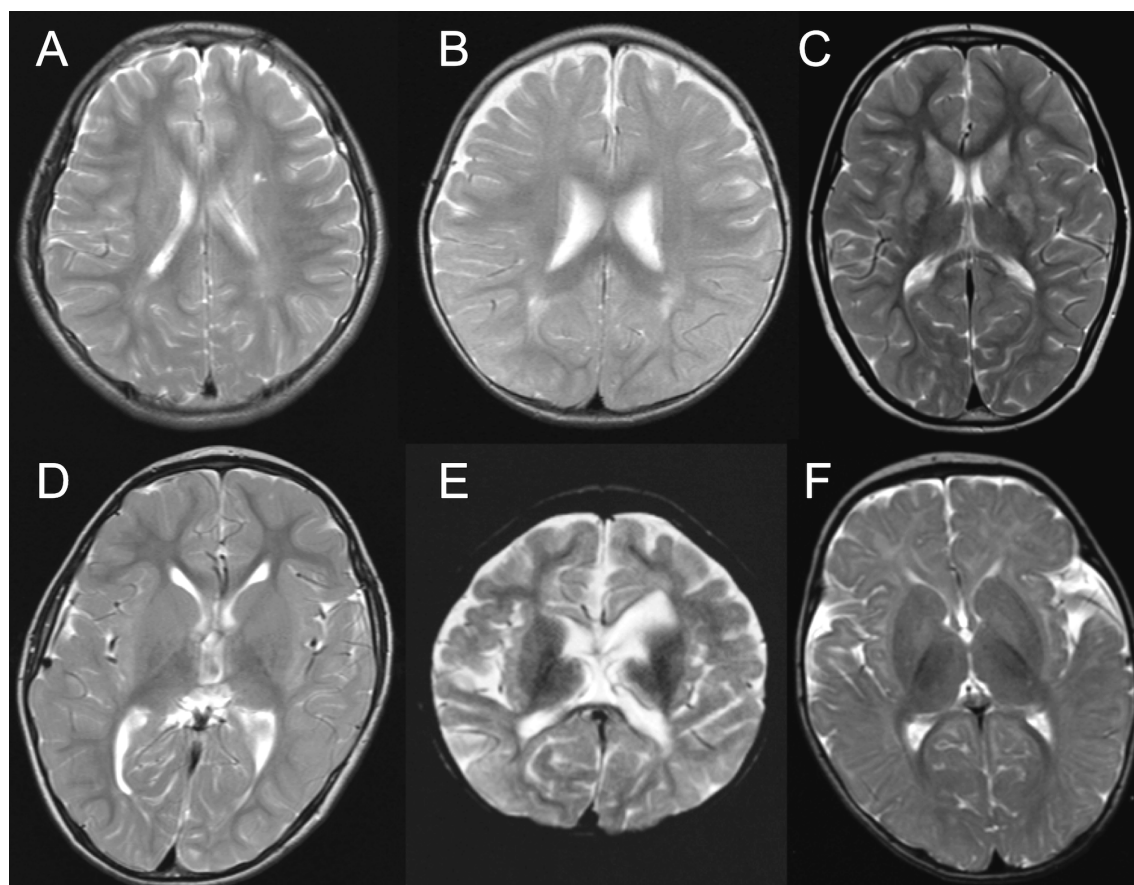
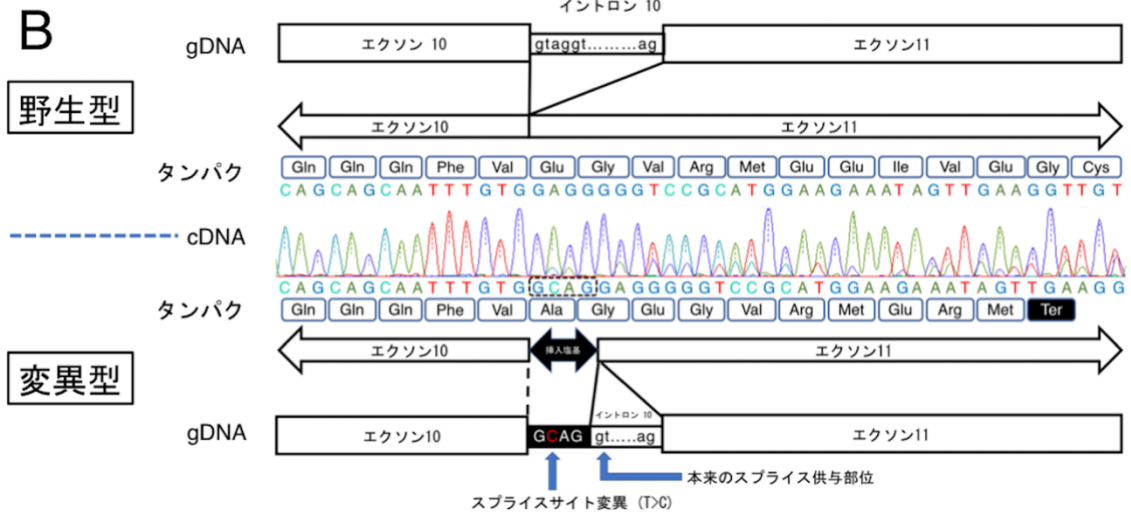
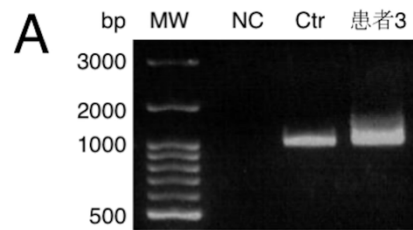


図 4

CTNNB1



AMPD2

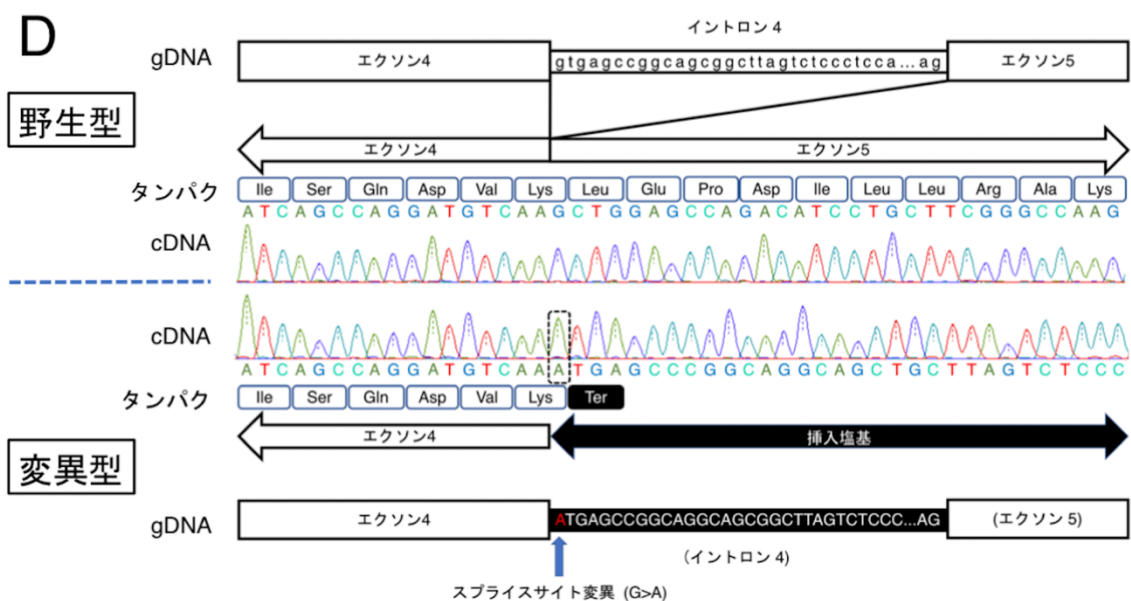
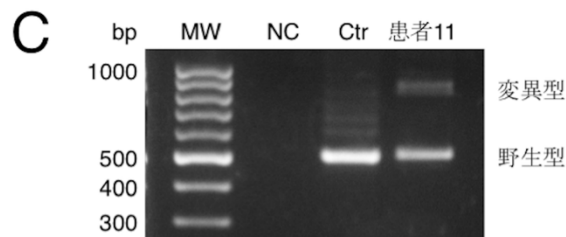
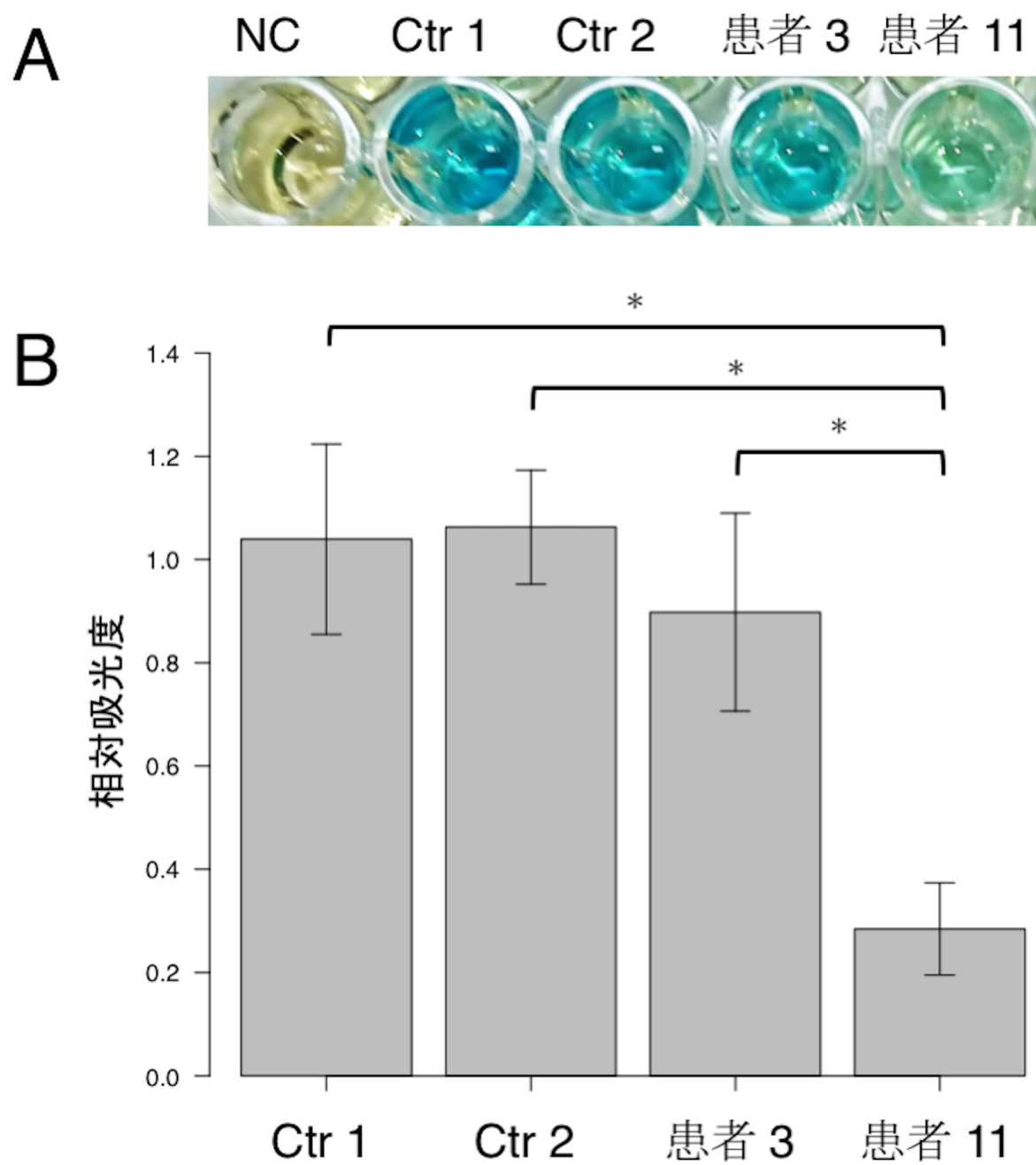


图 5



【図の説明】

図 1: 患者フローチャート

各除外基準および各群の患者数を示す。

図 2: 全エクソーム解析による候補遺伝子変異の絞り込み

アミノ酸置換を伴わない同義置換点変異を除き、次に各データベースを参照し、検索する遺伝形式に応じて一定頻度以上の対立遺伝子頻度がある変異を除外した。*de novo* 変異(常染色体優性形式)については 1000 Genomes database, the NHLBI Exome Sequencing Project, the ExAC database version 0.3 (全世界および東アジア), the Human Genetic Variation Database に登録されている変異を除外した。常染色体劣性遺伝形式および性染色体優性遺伝形式については、上記各データベースで 1%以上の頻度がある変異を除外した。さらに各データベースにホモ接合体、もしくは X 染色体であればヘミ接合体が登録されている変異を除外した。抽出した低頻度変異から、OMIM で神経発達疾患の原因とされる遺伝子の変異のみを候補変異として選別した。選別された各々の候補変異を ACMG ガイドラインに照らし合わせて病的意義を評価した。

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

ACMG: the American College of Medical Genetics and Genomics

図 3: 非特異的な頭部 MRI 所見 (T2 強調像)

非特異的な頭部 MRI 所見を示した患者とその画像を示す。

A: 患者 5; 左側脳室体部周囲の深部白質高信号

B: 患者 7; 左三角部のわずかな高信号

C: 患者 11; 線条体の高信号と脳梁の菲薄化

D: 患者 13; 脳梁の菲薄化と軽度の左側脳室拡大

E: 患者 14; 脳梁の菲薄化と大脳白質の萎縮

F: 患者 16; 両側淡蒼球のわずかな高信号

図 4: スプライスサイト変異の解析 (患者 3; *CTNNB1* 患者 11; *AMPD2*)

(A) 電気泳動による *CTNNB1* の部分的な cDNA 産物

bp: 塩基対, MW: 分子量, NC: 陰性コントロール, Ctr: 健常コントロール

(B) *CTNNB1* 遺伝子の cDNA 産物シーケンス配列

RT-PCR によって得られた exon 10-11 に対応した cDNA 産物 (上: 野生型, 下: 変異型)。対応したアミノ酸配列を示す。変異と変異による終止コドン(矢印)を示している。塩基置換により 4 塩基先に新たなスプライスドナーサイトが作られ、4 塩基の挿入が起こることでフレームシフトが惹起される。結果的に終止コドンが新たに形成され、タンパクが短縮する。

(C) 電気泳動による *AMPD2* の部分的な cDNA 産物

500 塩基対ほど長い cDNA 産物を患者 11 で認める。

bp: 塩基対, MW: 分子量, NC: 陰性コントロール, Ctr: 健常コントロール

(D) *AMPD2* 遺伝子の cDNA 産物シーケンス配列

RT-PCR によって得られた exon 4-5 に対応した cDNA 産物 (上: 野生型, 下: 変異型)。対応したアミノ酸配列を示す。変異と変異による終止コドン(矢印)を示している。塩基置換によりスプライスサイトが消失し、イントロン 4 が全てエクソン化する。その結果終止コドンが新たに形成され、タンパクが短縮する。

図 5: AMP デアミナーゼアッセイ

NC: 陰性コントロール, Ctr: 健常コントロール

(A) 青色が相対的な酵素活性を表している。

AMPD2 変異をもつ患者 11 は健常コントロールおよび患者 3 に比べ青色が薄く、アンモニア産生量が少ないことが示唆される。

(B) 625 nm での相対的な吸光度定量: \pm SD * $P < 0.001$ (ダネット法)

AMPD2 変異をもつ患者 11 は健常コントロールおよび患者 3 の各吸光度と比較し、いずれも有意に 60%程度の減少を認め、アンモニア産生能、すなわち AMPD2 活性の低下を示唆した。

13.表

	標的遺伝子	標的塩基	塩基配列
1	<i>AMPD2</i>	1:110168415	TAGTGCCCCGTATGAGTTCC
2	<i>AMPD2</i>	1:110168415	CCCTGTGCTGTTCTCACTCA
3	<i>AMPD2</i>	1:110171419	TCAAGGAGGGTAGGCAGATG
4	<i>AMPD2</i>	1:110171419	CCCTGACCCCTTGAATATGAC
5	<i>AMPD2</i> (cDNA)	1:110168415	GAGATTTTGGTGGGGTCTCA
6	<i>AMPD2</i> (cDNA)	1:110168415	TATGGCAGCTCCACCTCTGAG
7	<i>SCN2A</i>	2:166245610	AAGATCACCCCTGGAAGCTCA
8	<i>SCN2A</i>	2:166245610	AGGGCATCTGCAAAATCAGAAAG
9	<i>SPAST</i>	2:32361662	TCCCCTTTCTCAAACCAAATC
10	<i>SPAST</i>	2:32361662	TCATCTCCAGCAGACTGTACC
11	<i>SPAST</i>	2:32366975	CAAAATGCATTCCAGTGCC
12	<i>SPAST</i>	2:32366975	AAAGTAGCTGTACCATGGATTGG
13	<i>CTNNB1</i>	3:41275790	TCGAAATCTTGCCCTTTGTC
14	<i>CTNNB1</i>	3:41275790	TGACCATGTGAAGGACGTGT
15	<i>CTNNB1</i> (cDNA)	3:41275790	AGAGATGGCCCAGAATGCAG
16	<i>CTNNB1</i> (cDNA)	3:41275790	TCTGCAGCTTCCTTGTCCTG
17	<i>CYP2U1</i>	4:108866283	GGTCTGTTCACTGTTATCAGGAATAC
18	<i>CYP2U1</i>	4:108866283	TCCTTAAATGGTCCAAAGGG
19	<i>FAT4</i>	4:126238810	GCTACGCCTCGGTAGATGAG
20	<i>FAT4</i>	4:126238810	ACAAAAATCACCAGGCTTGC
21	<i>FAT4</i>	4:126411082	CAGCTGGATGATGGTTCTGA
22	<i>FAT4</i>	4:126411082	GGCAGCCAATCTTCACTGAG
23	<i>GPR98</i>	5:89979443	CTGCCTGCAGCAGTCTTGTA

24	<i>GPR98</i>	5:89979443	CTCCCAAAGAACCACTGGAA
25	<i>GPR98</i>	5:90086965	TTTTCACCATTTGCTGATGGA
26	<i>GPR98</i>	5:90086965	CGGTAACAATCGGCTGTTCT
27	<i>STXBP1</i>	9:130428484	ACAAGAGGGGTTTCGCTAGGT
28	<i>STXBP1</i>	9:130428484	CAGAGCGAGACTCCATCTCA
29	<i>SPTBN2</i>	11:66455748	GCTGGTTCACACTCCACAGA
30	<i>SPTBN2</i>	11:66455748	GAAGCCATTGAGACGGACAT
31	<i>SPTBN2</i>	11:66475070	TGACCAAAGGCAACACAGAA
32	<i>SPTBN2</i>	11:66475070	GTCCCCACCATCTTCTCAAA
33	<i>GNAO1</i>	16:56385308	TGTCTCTGTGTCTCCCTCCC
34	<i>GNAO1</i>	16:56385308	GAGCAGCCTGTTCTCTGAGC
35	<i>CACNA1A</i>	19:13476262	GAGAGACCTGGGCGTCTTG
36	<i>CACNA1A</i>	19:13476262	CCAAGAGCTTGTCCTGAAG
37	<i>UBA1</i>	X:47069086	TAATAATGCCTGCGGAAACC
38	<i>UBA1</i>	X:47069086	GCCTGGTGCCAAGTGTTACT
39	<i>AMER1</i>	X:63412347	TGTCACATCCCCAAACAAGA
40	<i>AMER1</i>	X:63412347	GCCCCTAGAAAGGAAAATGC

表 1. 各サンガーシーケンス, PCR に用いたプライマー

患者	性	年齢	脳性麻痺 診断月齢	経過観察 期間(月)	分類	在胎 週数	出生体重 (SD), g	出生頭囲 (SD), cm	周産期合併症	頭部 MRI 所見	知的 障害	てんかん	自閉症 スペクトラム	他の合併症	GMFCS	MACS	CFCS
1	男	8	23	91	D	40	3066(-0.5)	34.0(+0.5)	-	正常	あり	なし	なし	視神経萎縮	5	5	3
2	男	30	74	358	S	41	3310 (-0.3)	N/D	新生児仮死 胎便吸引症候群 動脈管開存症	正常	あり	あり	なし	小頭症	2	4	4
3	男	7	58	87	S	40	3428 (+0.7)	35.0 (+1.1)	-	正常	あり	なし	なし	過剰驚愕症	4	3	3
4	男	9	51	63	S	38	3208 (-0.4)	33.5 (-0.5)	-	正常	なし	なし	なし	-	3	1	1
5	男	22	38	260	S	37	2890 (-0.4)	32.5 (-0.5)	-	白質高信号	あり	なし	なし	-	4	5	2
6	男	7	30	64	S	37	3182 (+1.0)	N/D	-	正常	あり	なし	なし	-	2	1	1
7	女	7	16	81	D	38	2780 (-0.6)	32.5 (-0.5)	-	白質高信号	あり	なし	なし	-	5	5	4
8	男	15	164	26	S	40	3120 (-0.5)	34.0 (-0.5)	-	正常	あり	なし	あり	易刺激性	1	2	2
9	女	13	116	46	AT	41	3548 (+1.3)	32.5 (-0.5)	-	正常	あり	あり	なし	-	4	4	4
10	男	8	26	87	S	40	3086 (+0.0)	33.0 (-0.3)	-	正常	あり	なし	なし	-	4	3	2
11	女	5	22	51	S	38	2554 (-0.6)	30.0 (-2.2)	-	基底核高信号 白質萎縮	あり	なし	あり	易刺激性	4	4	5
12	女	3	31	32	AT	39	3134 (+0.4)	33.0 (-1.1)	-	正常	あり	なし	なし	企図振戦	2	4	4
13	男	10	40	84	S	40	3304 (+0.6)	31.8 (-1.2)	-	白質萎縮	あり	なし	あり	-	1	2	2
14	女	22	27	263	S	40	2930 (-0.2)	31.5 (-1.4)	-	皮質萎縮	あり	あり	なし	-	4	4	5
15	女	6	56	82	Mix (S, AT)	37	1736 (-2.6)	31.0 (-1.2)	SGA	正常	あり	なし	なし	VATER 症候群	2	3	3
16	男	11	25	130	D	37	3298 (+1.7)	35.5 (+2.1)	-	基底核高信号	あり	なし	なし	-	4	3	3
17	男	19	178	76	S	37	3094 (+1.1)	36.0 (+2.5)	-	正常	あり	あり	あり	溶血性貧血	2	4	5

表 2. 患者群の臨床的特徴

GMFCS: 粗大運動能力分類システム(Gross Motor Classification System), MACS: 手指操作能力分類システム(Manual Ability Classification System), CFCS: コミュニケーション能力分類システム(Communication Function Classification System), S: 痙性両麻痺(spastic diplegia), D: アテトーゼ型(dyskinetic type), AT: 失調型(ataxic type), Mix: 混合型(mixed type), N/D: データなし(no data), SGA: small for gestational age

患者	CNVs	遺伝子	OMIM	OMIM 疾患	脳性麻痺の 既報	遺伝形式	変異の部位 (hg19)	変異の種類	アミノ酸置換	病的変異 の既報	SIFT score	Polyphen2 HVAR	CADD phred	GER P-RS	ExAC	病原性分類
病的意義があると判定した候補変異																
3	なし	<i>CTNNB1</i>	114550	知的障害	なし	<i>De novo</i>	Chr3:41275790 T>C	スプライシング	p.Glu562AlafsTer11	なし	NA	NA	22.9	5.66	0	Pathogenic
5	なし	<i>CYP2U1</i>	610670	痙性両麻痺	なし	常染色体劣性	Chr4:108866283 del C	フレームシフト	p.(Phe218fsTer42)	なし	NA	NA	NA	NA	0	Pathogenic
6	なし	<i>SPAST</i>	604277	痙性両麻痺	あり	<i>De novo</i>	Chr2:32361662 C>T	ミスセンス	p.(Leu426Phe)	あり	0.002	0.999	32	5.62	0	Pathogenic
7	なし	<i>GNAO1</i>	139311	てんかん性脳症	なし	<i>De novo</i>	Chr16:56385308 G>A	ミスセンス	p.(Glu246Lys)	あり	0	1	22.7	5.91	0	Pathogenic
9	なし	<i>CACNA1A</i>	601011	脊髄小脳失調症 てんかん性脳症	なし	<i>De novo</i>	Chr19:13476262 G>A	ミスセンス	p.(Ser218Leu)	あり	0.002	0.998	33	5.55	0	Pathogenic
10	なし	<i>SPAST</i>	604277	痙性両麻痺	あり	<i>De novo</i>	Chr2:32366975 G>A	ミスセンス	p.(Arg499His)	あり	0	1	34	4.98	0	Pathogenic
11	なし	<i>AMPD2</i>	102771	痙性両麻痺 橋小脳低形成症	なし	常染色体劣性 (複合ヘテロ接合)	Chr1:110168415 G>A	スプライシング	p.Leu173Ter	なし	NA	NA	25.9	4.59	0	Pathogenic
							Chr1:110171419 C>T	ミスセンス	p.(Pro456Leu)	なし	0	1	34	5.08	0	Pathogenic
12	なし	<i>STXBP1</i>	612164	てんかん性脳症	あり	<i>De novo</i>	Chr9:130428484 C>G	ミスセンス	p.(Arg235Gly)	あり	0	1	34	5.72	0	Likely Pathogenic
17	なし	<i>SCN2A</i>	607745	てんかん性脳症	なし	<i>De novo</i>	Chr2:166245610 T>C	ミスセンス	p.(Leu1765Pro)	なし	0	1	25.6	5.72	0	Likely Pathogenic
病的意義が不明な候補変異																
2	XXY	<i>UBA1</i>	301830	脊髄筋萎縮症	なし	X-linked	ChrX:47069086 C>T	ミスセンス	p.(Thr668Ile)	なし	0.05	0.003	16.1	5.22	0	Unknown Significance
6	なし	<i>AMER1</i>	3006471	先天性線条性骨症	なし	X-linked	ChrX:63412347 G>A	ミスセンス	p.(Pro274Ser)	なし	0.07	0.001	0.61	0.174	0.00001	Unknown Significance
7	なし	<i>FAT4</i>	615546	Van Maldergem 症候群	なし	常染色体劣性 (複合ヘテロ接合)	Chr4:126238810 C>G	ミスセンス	p.(Pro415Arg)	なし	0.18	1	18.22	4.55	0.0002	Unknown Significance
							Chr4:126411082 A>G	ミスセンス	p.(Met4370Val)	なし	1	0	0.027	0.09	0.0012	Unknown Significance
15	なし	<i>GPR98</i>	602851	アッシュャー症候群 2C 型	なし	常染色体劣性 (複合ヘテロ接合)	Chr5:89979443 A>G	ミスセンス	p.(His1902Arg)	なし	0.32	0	9.526	-0.074	0	Unknown Significance
							Chr5:90086965 A>G	ミスセンス	p.(Ile4773Met)	なし	0.095	0.859	21.5	-10.8	0.0001	Unknown Significance
17	なし	<i>SPTBN2</i>	604985	脊髄小脳失調症	あり	常染色体劣性 (複合ヘテロ接合)	Chr11:66455748 C>T	ミスセンス	p.(Arg2089Lys)	なし	0.443	0.009	0.037	-6.45	0.0002	Unknown Significance
							Chr11:66475070 G>A	ミスセンス	p.(Arg524Trp)	なし	0	1	34	4.47	0	Unknown Significance

表 3. 全エクソーム解析により病的意義を疑われる変異およびアレイ CGH 解析の結果.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man; XXY: 47, XXY; NA: not applicable.

14. 謝辞

最初に，研究に御協力をいただきました患者様，御家族様に深謝致します。

本研究を行うにあたり，多くの方々から御指導をいただきました。

本大学小児病態学分野 菊池敦生先生には，総合的な御指導をいただきました。また同教室研究室の先生方にも，御助言，御指導をいただきました。

宮城県立こども病院神経科 萩野谷和裕先生には，貴重な患者様を御紹介いただいただけでなく，研究および論文作成にあたり，多岐にわたる様々なご指導，ご指摘をいただきました。

本大学技術補佐員 千葉洋子様，伊藤久美様，舘田葉子様には，多大なる技術的サポートをしていただきました。

最後に，多くの時間を割いて直接の御指導，御鞭撻をいただきました呉繁夫教授に心より深謝致します。